BD TCBS Agar

APPLICATION

La **BD TCBS Agar** (gélose TCBS à base de thiosulfate-citrate-sels biliaires-saccharose) est un milieu différentiel non sélectif utilisé pour l'isolement et la culture de *Vibrio cholerae* et d'autres *Vibrio* spp. partir d'échantillons cliniques et d'autres matières.

PRINCIPES ET EXPLICATION DE LA METHODE

Méthode microbiologique.

Dans le monde entier, les eaux saumâtres et les eaux salines constituent l'habitat naturel des vibrions.[1,2] Les infections intestinales rencontrées chez l'homme sont souvent associées à la consommation d'eau, de fruits de mer ou de poissons contaminés. *Vibrio cholerae* est l'agent étiologique d'une diarrhée sécrétoire (le choléra), dont la contagion s'effectue par l'absorption d'eau et de denrées contaminées, et par la voie oro-fécale.[2] Plusieurs autres *Vibrio* spp., p. ex. *V. parahaemolyticus* et *V. fluvialis*, sont responsables de la gastro-entérite aiguë. En outre, diverses *Vibrio* spp., p. ex. *V. alginolyticus, V. vulnificus,* et *V. damsela*, sont associées à des infections extraintestinales, telles que les infections de plaies, septicémies, méningites, et autres.[1-3] Il a été montré que les infections de plaies à *Vibrio* se produisent principalement chez les patients qui ont été en contact avec de l'eau salée ou saumâtre.[2,3]

Lorsqu'elle est préparée conformément à la formule élaborée par Kobayashi *et al.*, la **BD TCBS Agar** correspond à une version modifiée du milieu sélectif de Nakanishi.[4,5] Hormis *V. hollisa*e, la totalité des *Vibrio* spp. pathogènes pour l'homme se développent dans ce milieu. Recommandé pour l'isolement des *Vibrio* spp. à partir d'échantillons fécaux[1,2,6], ce milieu est cité dans les méthodes standard pour l'analyse des aliments (Standard Methods for food testing).[7,8] Il s'agit d'un milieu hautement sélectif, qui satisfait aux besoins nutritionnels des *Vibrio* spp., et permet aux vibrions d'entrer en compétition avec la flore intestinale. Tous les membres du genre sont susceptibles de se développer dans des milieux à fortes concentrations de sel et certaines espèces sont halophiles.[6]

Dans la **BD TCBS Agar**, l'extrait de levure et la peptone fournissent au milieu l'azote et les vitamines nécessaires. Le citrate de sodium, le thiosulfate de sodium, la bile de bœuf et le cholate sont des agents sélectifs qui permettent d'obtenir un pH alcalin pour inhiber les microorganismes Gram positifs et éliminer les coliformes. Le pH du milieu est augmenté afin de faciliter le développement de *Vibrio cholerae* car ce microorganisme est sensible aux environnements acides. La forte concentration de sodium favorise la croissance de *Vibrio cholerae*, qui est tolérant au sel, et celle d'autres *Vibrio* spp., dont la plupart sont halophiles. Le saccharose est un glucide fermentescible, et le chlorure de sodium stimule la croissance. Le thiosulfate de sodium sert de source de soufre et agit avec le citrate ferrique pour jouer le rôle d'indicateur de production d'acide sulfhydrique. Le bleu de bromothymol et le bleu de thymol sont des indicateurs de pH.

REACTIFS

BD TCBS Agar

Formule* par litre d'eau purifiée

Extrait de levure	5,0 g	Saccharose (Sucrose)	20,0 g
Digestion pancréatique de caséine	5,0	Chlorure de sodium	10,0
Digestion peptique de tissu animal	5,0	Citrate ferrique	1,0
Citrate de sodium	10,0	Bleu de bromothymol	0,04
Thiosulfate de sodium	10,0	Bleu de thymol	0,04
Bile de bœuf	5,0	Gélose	14,0
Cholate de sodium	3,0		

pH 8,6 ± 0,2

*Ajustée et/ou complémentée en fonction des critères de performances imposés.

PRECAUTIONS

IVD . A usage professionnel uniquement.
Ne pas utiliser de boîte de Pétri présentant des signes de contamination microbienne, décoloration, dessiccation ou fissure, ou d'autres signes de détérioration.
Consulter le document **MODE D'EMPLOI GENERAL** pour plus d'informations concernant les procédures de manipulation aseptique, les risques biologiques et l'élimination des produits usagés.

STOCKAGE ET DUREE DE CONSERVATION

Dès réception, conserver les boîtes de Pétri dans l'obscurité entre 2 et 8 °C, dans leur emballage d'origine, jusqu'au moment de leur utilisation. Ne pas les congeler ni les surchauffer. Les boîtes peuvent être ensemencées jusqu'à la date de péremption indiquée (voir l'étiquette de l'emballage), et incubées pendant les durées recommandées.
Des boîtes provenant d'une pile ouverte de 10 boîtes sont utilisables pour une semaine lorsqu'elles sont conservées entre +2 et +8 °C dans un endroit propre.

CONTROLE DE QUALITE PAR L'UTILISATEUR

Ensemencer des échantillons représentatifs avec les souches suivantes (pour plus de détails, voir le document **MODE D'EMPLOI GENERAL**). Incuber en conditions aérobie pendant 18 à 24 h, entre 35 et 37 °C.

Souches	Croissance
V. cholerae NCTC 8021 ou ATCC 9459	Croissance moyenne à importante ; zones de couleur jaune en périphérie des colonies
V. parahaemolyticus ATCC 17802	Croissance moyenne à importante ; colonies vertes à bleu vert ; milieu pratiquement inchangé
V. alginolyticus ATCC 17749	Croissance moyenne à importante ; zones de couleur jaune en périphérie des colonies
E. faecalis ATCC 29212	Inhibition partielle à complète ; petites colonies jaunes
E. coli ATCC 25922	Inhibition partielle à complète ; colonies de petite taille, translucides
Ps. aeruginosa ATCC 27853	Inhibition partielle à complète ; colonies bleues
Sans ensemencement	Colonies de couleur verte à bleu-vert

METHODE

Matériaux fournis
BD TCBS Agar (boîtes de Pétri **Stacker** de 90 mm). Produits contrôlés microbiologiquement.

Matériaux non fournis
Milieux de culture auxiliaires, réactifs et matériel de laboratoire requis.

Types et transport des échantillons
Ce milieu est utilisé pour l'isolement des *Vibrio* spp. à partir d'échantillons fécaux (en particulier si les patients ont consommé du poisson ou des fruits de mer) ou à partir d'échantillons cliniques extraintestinaux si la présence de *Vibrio* spp. est présumée (voir aussi **CARACTERISTIQUES DES PERFORMANCES ET LIMITES DE LA PROCEDURE**). Il est également possible d'utiliser des échantillons tels que les écouvillons rectaux, le vomi et les échantillons alimentaires. Pour transporter les écouvillons, il convient d'utiliser le milieu de transport Cary-Blair car les *Vibrio* spp. sont particulièrement sensibles au dessèchement.[2] Tous les échantillons intestinaux et alimentaires peuvent être placés dans des tubes additionnés d'eau alcaline peptonée afin d'empêcher toute dessiccation des matières, et doivent être transportés sans tarder jusqu'au laboratoire. Les délais d'acheminement de plus de 8 h réduisent la viabilité des échantillons. Ne pas congeler les échantillons !

Mode opératoire du test
Strier l'échantillon sur une **BD TCBS Agar** dès son arrivée au laboratoire, en utilisant une technique de striation approuvée. Les échantillons alimentaires et autres peuvent être écouvillonnés directement, ou après avoir procédé à une homogénisation minutieuse (en particulier si les échantillons testés sont du poisson ou des fruits de mer). Eviter tout dessèchement lors de la manipulation. Il convient d'inclure un milieu moins sélectif, tel que la **BD DCLS Agar**, qui s'est révélée plus efficace qu'une MacConkey Agar en matière d'isolement des *Vibrio* spp. Tous les échantillons extraintestinaux (p. ex. les échantillons prélevés sur des plaies, etc.) doivent également être étalés sur un milieu non sélectif à base de gélose au sang, p. ex. une **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood**, et dans une boîte de **BD MacConkey II Agar**, afin de permettre de déceler la présence éventuelle d'autres pathogènes susceptibles d'être impliqués dans l'apparition de l'infection. Incuber les boîtes de Pétri en conditions aérobie entre 35 et 37 °C pendant 18 à 24 h. Si le résultat est négatif, incuber pendant 18 à 24 h supplémentaires.
Il est possible de commencer par enrichir les échantillons, cliniques et autres, dont on présume qu'ils contiennent de faibles comptes de *Vibrio*, en incubant une aliquote de l'échantillon dans une eau alcaline peptonée, à 35 $\pm$ 2 °C.[2,8] Effectuer des repiquages sur gélose TCBS et au sang au bout de 8 h, puis de nouveau après 18 h d'incubation.

Résultats
Sur **BD TCBS Agar**, les vibrions qui fermentent le saccharose *(V. cholera*e, V. *alginolyticus, V. harveyi, V. cincinnatiensis, V. fluvialis, V. furnissii, V. metschnikovii*) apparaissent sous forme de colonies de taille moyenne, lisses, opaques et jaunes. La plupart des autres vibrions importants au plan clinique, notamment *V. parahaemolyticus*, ne fermentent pas le saccharose et se présentent sous forme de colonies vertes.[2] Des tests biochimiques et/ou sérologiques sont nécessaires pour obtenir une identification définitive et pour la différenciation des espèces capables de fermenter le saccharose de celles qui ne le sont pas.[1,2,7,8]

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES ET LIMITES DE LA PROCEDURE
La **BD TCBS Agar** est un milieu standard pour l'isolement de *Vibrio cholera* ou d'autres *Vibrio* spp. à partir d'échantillons fécaux issus de patients atteints de diarrhée, surtout s'ils ont consommé du poisson ou des fruits de mer, ou si des cas de choléra sont présumés.[1,2,6,7] Ce milieu peut aussi être utilisé pour déceler la présence éventuelle de *Vibrio* dans des échantillons extraintestinaux.
La **BD TCBS Agar** est aussi un milieu standard pour l'isolement de *Vibrio* dans les produits alimentaires.[8,9]

Les besoins nutritionnels des microorganismes étant variables, il est possible que certaines souches se développent peu dans ce milieu. Par conséquent, il convient d'utiliser un milieu moins sélectif adapté à la mise en évidence des *Vibrio* spp. et d'autres pathogènes intestinaux (p. ex. *Salmonella* et *Shigella*) ; la **BD DCLS Agar** peut être recommandée à cette fin.
Sur **BD TCBS Agar**, *V. parahaemolyticus* est susceptible de présenter un aspect similaire aux *Aeromonas hydrophila, Plesiomonas shigelloides* et *Pseudomonas* spp. Les *Proteus* spp. qui fermentent le saccharose produisent des colonies jaunes, susceptibles de ressembler aux colonies de *Vibri*o. Quelques souches de *V. cholerae* sont vertes ou incolores sur **BD TCBS Agar**, en raison d'un retard dans la fermentation du saccharose.
Les milieux TCBS ne sont pas adaptés à l'application du test d'oxydase sur les *Vibrio* spp.[2]
Des tests supplémentaires sont nécessaires pour obtenir une identification complète et confirmer l'identification des *Vibrio* spp. isolées dans ce milieu. Consulter les documents cités en référence.[2,6-9]

REFERENCES

1. Baron, E. J., L. R. Peterson, and S. M. Finegold. 1994. *Vibrio* and related species, *Aeromona*s, *Plesiomona*s, *Campylobacte*r, *Helicobacte*r, and others, p. 429-444. Bailey & Scott’s diagnostic microbiology, 9th ed. Mosby-Year Book, Inc., St. Louis, MO.

2. Farmer III, J.J., J.M. Janda, and K. Birkhead. *Vibrio*. *In:* Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Yolken (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
3. Pavia, A.T., et al. 1989. *Vibrio carchariae* infection after a shark bite. Ann. Intern. Med. 111: 85-86.
4. Kobayashi, T., S. Enomoto, R. Sakazaki, and S. Kuwahara. 1963. A new selective medium for pathogenic vibrios, TCBS (modified Nakanishi's agar). Jpn. J. Bacteriol. 18:387.
5. Nakanishi, Y. 1963. An isolation agar medium for cholerae and enteropathogenic halophilic vibrios. Modern Media 9:246.
6. Grasmick, A. 1992. Processing and Interpretation of bacterial fecal cultures. *In:* Isenberg D (ed): Clinical microbiology procedures handbook, Volume 1. Aerobic bacteriology (section editor: Pezzlo M). pp. 1.10.1-1.10.21. American Society for Microbiology, Washington, DC.
7. Kist, M., et al. 2000. Infektionen des Darmes. *In:* Mauch, H., Lüttiken, R., and S. Gatermann (eds.): MiQ - Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik, vol. 9. Urban & Fischer, Munich, Germany.
8. Association of Official Analytical Chemists. 1995. Bacteriological analytical manual, 8th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.
9. Downes, F.P., and K. Ito. 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th edition. American Public Health Association (APHA). Washington, D.C. USA.

CONDITIONNEMENT

BD TCBS Agar

N° réf. 254432 Milieux en boîtes de Pétri prêts à l'emploi, 20 unités par carton

INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES

Pour plus d'informations, contacter le représentant local de BD.



BD Diagnostic Systems
Tullastrasse 8 – 12
D-69126 Heidelberg/Germany
Phone: +49-62 21-30 50 Fax: +49-62 21-30 52 16
Reception_Germany@europe.bd.com

BD Diagnostic Systems Europe
Becton Dickinson France SA
11 rue Aristide Bergès
38800 Le Pont de Claix/France
Tel: +33-476 68 3636 Fax: +33-476 68 3292 http://www.bd.com